

10/511 111

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP 03/04627  
11.04.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年 4月12日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-111247

[ST.10/C]: [JP2002-111247]

出 願 人  
Applicant(s): 興和株式会社  
日産化学工業株式会社

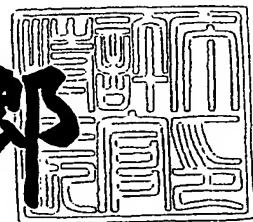
REC'D 06 JUN 2003  
WIPO PCT

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月20日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3036747

【書類名】 特許願

【整理番号】 PA500517

【提出日】 平成14年 4月12日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

    【住所又は居所】 福井県吉田郡松岡町下合月 2 3

    【氏名】 笈田 耕治

【特許出願人】

    【識別番号】 000163006

    【氏名又は名称】 興和株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100102668

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 佐伯 憲生

    【電話番号】 03-5205-2521

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 039251

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規なトロンボモジュリン発現促進剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 HMG-C o A還元酵素阻害剤を有効成分とするトロンボモジュリン発現促進剤。

【請求項 2】 HMG-C o A還元酵素阻害剤が、 (+) - (3 R, 5 S, 6 E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 3 - キノリル] - 3, 5 - ジヒドロキシ - 6 - ヘプテン酸又はその塩である請求項 1 に記載のトロンボモジュリン発現促進剤。

【請求項 3】 (+) - (3 R, 5 S, 6 E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 3 - キノリル] - 3, 5 - ジヒドロキシ - 6 - ヘプテン酸又はその塩を有効成分とする抗血栓剤。

【請求項 4】 (+) - (3 R, 5 S, 6 E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 3 - キノリル] - 3, 5 - ジヒドロキシ - 6 - ヘプテン酸又はその塩を有効成分とする敗血症予防・治療剤。

【請求項 5】 (+) - (3 R, 5 S, 6 E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 3 - キノリル] - 3, 5 - ジヒドロキシ - 6 - ヘプテン酸又はその塩を有効成分とする抗血小板剤。

【請求項 6】 (+) - (3 R, 5 S, 6 E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 3 - キノリル] - 3, 5 - ジヒドロキシ - 6 - ヘプテン酸又はその塩を有効成分とする抗凝固剤。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は HMG-C o A還元酵素阻害剤、特に (+) - (3 R, 5 S, 6 E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 3 - キノリル] - 3, 5 - ジヒドロキシ - 6 - ヘプテン酸又はその塩（以下、ピタバスタチンと略すことが有る）を有効成分とするトロンボモジュリン発現促進剤に関する。トロンボモジュリンは抗血液凝固物質であり、血液凝固能異常に関わる疾患及び／

又は敗血症の予防及び治療剤として有用である。また、本発明は、ピタバスタチン又はその塩を有効成分とする抗血栓剤、敗血症予防・治療剤、抗血小板剤、及び抗凝固剤に関する。

#### 【 0 0 0 2 】

##### 【従来の技術】

トロンボモジュリン（以下、TMと略すことがある。）は、血管内皮細胞膜上に存在する糖蛋白のひとつであり、トロンビンに結合し、トロンビンによるプロテインC活性化の補酵素として、主に血液凝固系の調節因子として機能している。

また近年、敗血症患者において活性型プロテインCが減少していることが明らかとなっており、プロテインC活性化の補酵素であるTMが敗血症の予防・治療剤として有望視されている（N Engl J Med, Vol. 344, No.10 759-762 (2001)）。

HMG-C o A還元酵素阻害剤（以下、スタチンと略すことが有る。）は、本来のLDL-コレステロール低下作用の他に、脂質代謝以外への効果、すなわち内皮細胞機能の改善、平滑筋細胞の増殖・遊走の抑制、プラークの安定化（マクロファージ泡沫化抑制やマトリクスプロテアーゼ（MMP）の発現抑制など）、抗血栓作用、抗酸化作用などの多面的機能（pleiotropic effect）を持つことが近年明らかになっている。

スタチンの抗血栓作用については、これまでLDLの酸化抑制による内皮細胞の抗血栓作用改善（Atherosclerosis, Vol. 138, p271-280 (1998)）、凝固第VII因子の活性化抑制作用（Atheroscler Tromb Vasc Biol, Vol. 17, p265-272 (1997).）、血小板機能の亢進抑制作用（Atheroscler Tromb Vasc Biol, Vol. 15, p247-251 (1995)）、血小板の粘着抑制作用（Atheroscler Tromb Vasc Biol, Vol. 19, p1812-1817 (1999)）などが報告されている。

しかしながら、スタチンのTMの発現促進作用については全く知られていなかった。

#### 【 0 0 0 3 】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、HMG-C o A還元酵素阻害剤、特に (+) - (3 R, 5 S, 6 E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 3 - キノリル] - 3, 5 - ジヒドロキシ - 6 - ヘプテン酸又はその塩の新規な薬理作用を提供するものである。より詳細には、本発明は、TMの発現を調節できる薬剤を提供することにある。

## 【0 0 0 4】

## 【課題を解決するための手段】

そこで本発明者らは、血管内皮細胞を用いてTMのmRNA及び蛋白の発現に影響を及ぼす物質を探索した結果、全く意外にもスタチンにTMの発現促進作用が有り、しかも特にピタバスタチンに強いTM発現促進作用が有ることを見出し、本発明を完成するに至った。

## 【0 0 0 5】

すなわち、本発明は、HMG-C o A還元酵素阻害剤、特に (+) - (3 R, 5 S, 6 E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 3 - キノリル] - 3, 5 - ジヒドロキシ - 6 - ヘプテン酸又はその塩を有効成分とするTM発現促進剤を提供するものである。

## 【0 0 0 6】

スタチンは高脂血症治療剤として知られている化合物であるが、スタチンがTMの発現に作用するか否かについては全く知られていない。

スタチンとしては、特に制限されるものではないが、例えば米国特許第4, 739, 073号及びヨーロッパ特許願第114, 027号；ヨーロッパ特許出願公開第367, 895号；米国特許第5, 001, 255号、第4, 613, 610号、第4, 851, 427号、第4, 755, 606号及び第4, 808, 607号、第4, 751, 235号、第4, 939, 159号、第4, 822, 799号、第4, 804, 679号、第4, 876, 280号、第4, 829, 081号、第4, 927, 851号、第4, 588, 715号；及びF. G. Kathawala, Medical Research Reviews, 11, 121-146 (1991)、また、ヨーロッパ特許出願公開第304, 063号；ヨーロッパ特許出願公開第330, 057号及び米国特許第5, 026, 708号及び第4, 868, 185号；ヨーロッパ特

許出願公開第 3 2 4, 3 4 7 号; ヨーロッパ特許出願公開第 3 0 0, 2 7 8 号; 米国特許第 5, 0 1 3, 7 4 9 号、第 5, 8 7 2, 1 3 0 号及び第 5, 8 5 6, 3 3 6 号、米国特許第 4, 2 3 1, 9 3 8 号、米国特許第 4, 4 4 4, 7 8 4 号、米国特許第 4, 3 4 6, 2 2 7 号、米国特許第 5, 3 5 4, 7 7 2 号、米国特許第 5, 2 7 3, 9 9 5 号、米国特許第 5, 1 7 7, 0 8 0 号、米国特許第 3, 9 8 3, 1 4 0 号、日本国特許第 2, 6 4 8, 8 9 7 号、米国特許第 5, 2 6 0, 4 4 0 号あるいは Bioorganic & Medicinal Chemistry, 5, pp437, (1977) および日本国特許第 2, 5 6 9, 7 4 6 号、ヨーロッパ特許第 3 0 4, 0 6 3 号あるいは米国特許第 5, 8 5 6, 3 3 6 号に記載されている。

【 0 0 0 7 】

特に、米国特許第 4, 2 3 1, 9 3 8 号にはロバスタチンが、米国特許第 4, 4 4 4, 7 8 4 号にはシンバスタチンが、米国特許第 4, 3 4 6, 2 2 7 号にはプラバスタチンが、米国特許第 5, 3 5 4, 7 7 2 号にはフルバスタチンが、米国特許第 5, 2 7 3, 9 9 5 号にはアトルバスタチンが、米国特許第 5, 1 7 7, 0 8 0 号にはセリバスタチンが、米国特許第 3, 9 8 3, 1 4 0 号にはメバスタチンが、また日本国特許第 2, 6 4 8, 8 9 7 号、米国特許第 5, 2 6 0, 4 4 0 号あるいは Bioorganic & Medicinal Chemistry, 5, pp437, (1977) にはロスバスタチン、すなわちモノカルシウム ビス (+) - 7 - [ 4 - ( 4 - フルオロフェニル ) - 6 - イソプロピル - 2 - ( N - メチル - N - メタンスルフォニルアミノピリミジン ) - 5 - イル ] - ( 3 R, 5 S ) - ジヒドロキシー ( E ) - 6 - ヘプテノエートが記載されている。同様にピタバスタチンカルシウムは、日本国特許第 2, 5 6 9, 7 4 6 号、ヨーロッパ特許第 3 0 4, 0 6 3 号あるいは米国特許第 5, 8 5 6, 3 3 6 号に記載されている。

【 0 0 0 8 】

本発明の TM 発現促進剤は、抗血液凝固作用及び血小板凝集抑制作用を有し、抗血液凝固活性をコントロールすることが望まれる疾患の予防及び治療において、抗血栓剤（抗血小板剤及び／又は抗凝固剤）及び／又は敗血症の予防・治療剤として有用である。

本発明の TM 発現促進剤を医薬として用いる場合の投与形態としては、例えば

錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤などによる経口投与又は静脈内注射剤、筋肉注射剤、坐剤、吸入剤、経皮吸収剤、点眼剤、点鼻剤などによる非経口投与が挙げられる。またこのような種々の剤型の医薬製剤を調製するには、この有効成分を単独で、又は他の薬学的に許容される賦形剤、結合剤、増量剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、矯味剤、香料、被膜剤、担体、希釈剤などを適宜組み合わせ用いることができる。これらの投与形態のうち、好ましい形態は経口投与であり、経口投与用製剤の調製にあたっては、有効成分の安定性を考慮して例えば特開平 2 - 6 4 0 6 号、特許第 2, 7 7 4, 0 3 7 号、WO 9 7 / 2 3 2 0 0 の記載に従って pH を調整するのが好ましい。本発明の医薬の投与量は、患者の体重、年齢、性別、症状等によって異なるが、通常成人の場合、一般式 (1) で表される化合物として、一日 0. 0 1 ~ 1 0 0 0 mg、特に 0. 1 ~ 1 0 0 mg を、1 回又は数回に分けて経口投与又は非経口投与するのが好ましい。

本発明の TM 発現促進剤は、経口投与又は非経口投与により投与される。

本発明の TM 発現促進剤の投与量は、患者の体重、年齢、性別、症状等によって異なるが、通常成人の場合、一日 0. 0 1 ~ 1 0 0 0 mg、好ましくは 0. 1 ~ 1 0 0 mg を 1 ~ 3 回に分けて投与するのが好ましい。

#### 【0009】

##### 【実施例】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

#### 【0010】

##### 実施例 1

正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) を 2 % (vol/vol) 牛胎児血清、5 0  $\mu$  g/ml ゲンタマイシン、5 0 ng/ml アンフォテリシン B、1 0 ng/ml hEGF、5 n g/ml hFGF-B、1  $\mu$  g/ml ハイドロコルチゾン及び 1 0  $\mu$  g/ml ヘパリンを添加した HuMedia-EG2 培地 (クラボウ社) の 2 4 穴プレートに  $2 \times 10^5$  cells/well になるように撒く。次に、各検体 (ピタバスタチン、フルバスタチン及びプラバスタチン) を終濃度  $10^{-7}$  M ~  $10^{-3}$  M となるように培地に加え、5 % CO

2、37℃の条件下で24時間培養した。培養後、リン酸緩衝液 (pH7.4) で3回洗浄し、0.15 mol/L NaCl、0.5% Triton X-100、及び 1 mmol/L ベンズアミド ハイドロクロライドを含む50 mmol/L トリス-塩酸 (pH 7.4)に懸濁後、TMを抽出した。TM抗原量はTMmAb-2, 1-1及び20モノクローナル抗体を用いて酵素免疫測定法により測定した。コントロール (等量のDMSO (0.01%) を含む) を100%とした場合の、各検体の添加による細胞蛋白質中のTM抗原の存在量に与える影響を測定した

## 【0011】

結果を図1に示す。図1の縦軸はTM抗原量/細胞蛋白質をコントロールに対する比率 (%) で示したものである。横軸は各スタチンの濃度を示す。各濃度における白抜き部分はピタバスタチン (Pit)、黒抜きはフルバスタチン (Flu)、及び灰色抜きはプラバスタチン (Pra) をそれぞれ示す。

この結果、何れのスタチンもTMの発現量を増大させることがわかる。特にピタバスタチン (Pit) による増加量が顕著であることがわかる。

## 【0012】

## 実施例2

HUVECsを2% (vol/vol) 牛胎児血清、50  $\mu$ g/ml ゲンタマイシン、50 ng/ml アンフォテリシン B、10 ng/ml hEGF、5 ng/ml hFGF-B、1  $\mu$ g/ml ハイドロコルチゾン及び10  $\mu$ g/ml ヘパリンを添加したHuMedia-EG2培地 (クラボウ社) に撒き、ピタバスタチン (終濃度 $10^{-5}$  M) を培地に加え、5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で一定時間毎培養した。総RNAはTRIZOL 試薬 (ライフ テクノロジー社) を用いて抽出し、定法のノーザンブロット法によりTM m-RNAの発現量を測定した

結果を図2に示す。図2の縦軸はTMの発現量をコントロールに対する比率 (%) で示したものである。横軸は時間 (時間) を示す。12時間後から急激に発現量が増加していることがわかる。

## 【0013】

## 【発明の効果】

本発明によれば、スタチンが主に血液凝固系の調節因子として機能しているT



Mの発現を促進し、特にピタバスタチンは他のスタチンに比較し有意にTMの発現を促進できるので、抗血栓剤及び／又は敗血症予防・治療剤として有用である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、本発明のスタチンによるトロンボモジュリンの抗原量の変化の結果を示すものである。図 1 の縦軸はTM抗原量／細胞蛋白質をコントロールに対する比率（％）で示したものである。横軸は各スタチンの濃度を示す。各濃度における白抜き部分はピタバスタチン（P i t）、黒抜きはフルバスタチン（F l u）、及び灰色抜きはプラバスタチン（P r a）をそれぞれ示す。

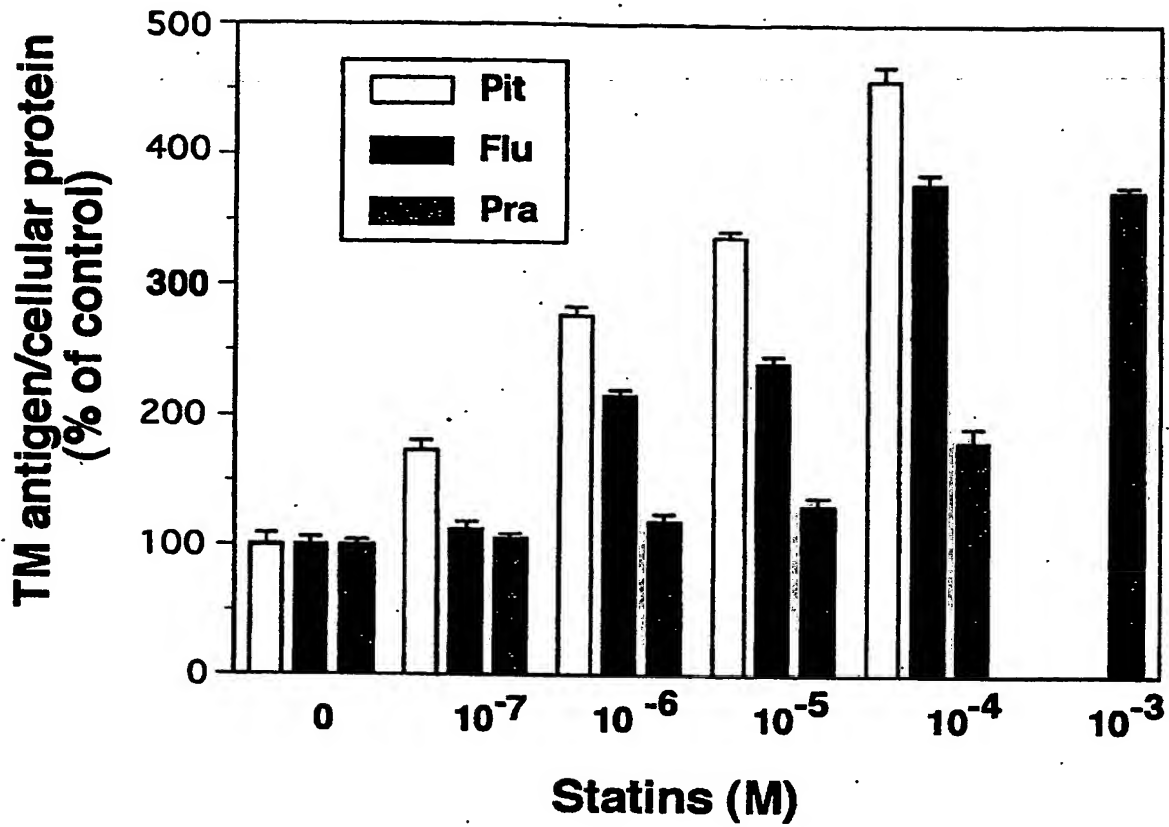
【図 2】

図 2 は、本発明のピタバスタチンによるトロンボモジュリンの発現量の経時変化を示したものである。図 2 の縦軸はTMの発現量をコントロールに対する比率（％）で示したものである。横軸は時間（時間）を示す。

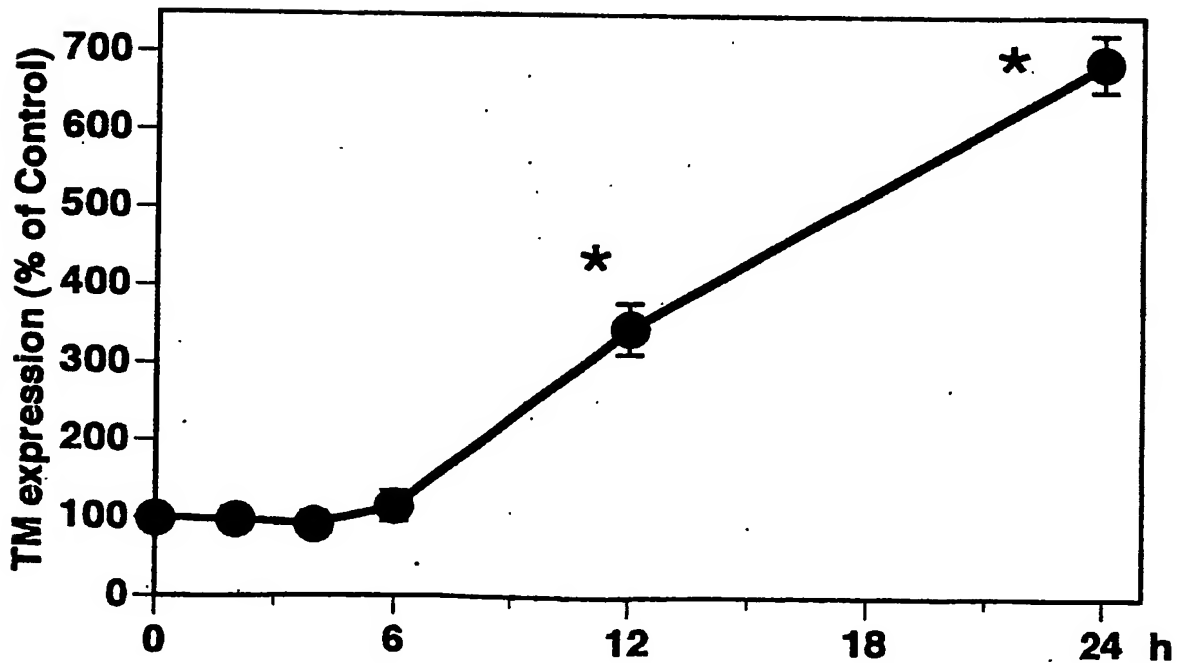
【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、HMG-C o A還元酵素阻害剤、特に (+) - (3 R, 5 S, 6 E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 3 - キノリル] - 3, 5 - ジヒドロキシ - 6 - ヘプテン酸又はその塩の新規な薬理作用を提供するものである。

【解決手段】 本発明は、HMG-C o A還元酵素阻害剤、特に (+) - (3 R, 5 S, 6 E) - 7 - [2 - シクロプロピル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 3 - キノリル] - 3, 5 - ジヒドロキシ - 6 - ヘプテン酸又はその塩を有効成分とする TM 発現促進剤、より具体的には抗血栓剤、敗血症予防・治療剤、抗血小板剤、及び抗凝固剤に関する。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届

【整理番号】 PA500517

【提出日】 平成14年 5月16日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2002-111247

【承継人】

【持分】 001/002

【識別番号】 000003986

【氏名又は名称】 日産化学工業株式会社

【代表者】 藤本 修一郎

【承継人代理人】

【識別番号】 100102668

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐伯 憲生

【電話番号】 03-5205-2521

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 039251

【納付金額】 4,200円

【ブルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-111247
受付番号	50200705228
書類名	出願人名義変更届
担当官	小松 清 1905
作成日	平成14年 7月 3日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】	000003986
【住所又は居所】	東京都千代田区神田錦町3丁目7番地1
【氏名又は名称】	日産化学工業株式会社

【承継人代理人】

申請人	
【識別番号】	100102668
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛ビル 9階 たくみ特許事務所
【氏名又は名称】	佐伯 憲生

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000163006]

1. 変更年月日 1990年 8月20日

[変更理由] 新規登録

住 所 愛知県名古屋市中区錦3丁目6番29号

氏 名 興和株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000003986]

1. 変更年月日 1990年 8月29日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区神田錦町3丁目7番地1

氏 名 日産化学工業株式会社